



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

FELIPE LUIZ DA SILVA

**CROMENONAS SINTÉTICAS COMO INIBIDORAS DE *QUORUM SENSING* EM
Vibrio harveyi.**

**CEILÂNDIA, DF
2013**

FELIPE LUIZ DA SILVA

**CROMENONAS SINTÉTICAS COMO INIBIDORAS DE *QUORUM SENSING* EM
Vibrio harveyi.**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira

CEILÂNDIA, DF

2013

FELIPE LUIZ DA SILVA

**CROMENONAS SINTÉTICAS COMO INIBIDORAS DE *QUORUM SENSING* EM
Vibrio harveyi.**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Alex Leite Pereira
(FCE/Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos
(FCE/Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
(FCE/Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF
2013

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos apresenta-se como um dos grandes desafios para a saúde pública, exigindo o desenvolvimento de novas alternativas para o controle de infecções. Nesse sentido, sistemas de *quorum sensing* (QS), que regulam genes envolvidos com a expressão de fatores de virulência, têm sido vislumbrados como potenciais alvos para o controle de infecções bacterianas. A descoberta dos sistemas de QS deu início à busca por drogas que visam atenuar a virulência ao invés do crescimento microbiano. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de cromenonas sintéticas sobre o sistema de *quorum sensing* da espécie bioluminescente *Vibrio harveyi*. Para isso, cromenonas, sintetizadas no Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas da Universidade de Brasília, denominadas de 6-oxo e 5-oxo, foram testadas a partir de duas metodologias diferentes. Uma revisão bibliográfica também foi realizada a fim de verificar registros do uso de cromenonas como inibidoras de QS. Quanto aos ensaios, a cromenona 6-oxo inibiu em até 60% o sistema de QS em relação à cultura controle, enquanto a 5-oxo apresentou efeito relativamente menor, chegando à inibição de 30%. A revisão não apontou uso de cromenonas como inibidoras de QS. Em conclusão, os resultados apontam para uma nova aplicação biológica das cromenonas e mostram que futuras alterações estruturais na molécula podem determinar efeitos inibitórios ainda maiores sobre QS, já que a mudança do posicionamento de um grupo funcional, que diferencia a 6-oxo da 5-oxo, dobrou o efeito inibitório sobre QS de *V. harveyi*.

Palavras-chave: *Quorum sensing* (QS), Inibidores de *quorum sensing* (QSI), Cromenonas sintéticas, Drogas antipatogênicas, *Vibrio harveyi*.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is presented as one of the major challenge to public health, requiring the development of new methods to control infections. Quorum sensing systems (QS), which regulate genes involved in the expression of virulence factors, have been envisioned as potential targets for controlling bacterial infections. The discovery of QS systems began the search for drugs targeting attenuate virulence instead microbial growth. This study aimed to evaluate the effect of synthetic chromenones on the quorum sensing system of the bioluminescent species *Vibrio harveyi*. Chromenones called 6-oxo and 5-oxo, synthesized in Organic Molecule Transformation and Isolation Laboratory, University of Brasília, were tested using two different methodologies. A literature review was also performed in order to verify reports on chromenones as QS inhibitors. Experimental data showed that 6-oxo chromenone inhibited QS system at 60% when compared with the control culture; while 5-oxo displayed a relatively minor effect, reaching only 30% of inhibition. The literature review found no records of the chromenones use on QS. In conclusion, the results suggest a new biological application for chromenones and show that hereafter structural changes in the molecule may provide even more inhibitory effects on QS, since the change of the position of a functional group that differentiates 6-oxo and 5-oxo doubled the inhibitory effect on QS of *V. harveyi*.

Keywords: *Quorum sensing* (QS), *Quorum sensing inhibitors* (QSI), Synthetic chromenones, Antipathogenic drugs, *Vibrio harveyi*.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
SUMÁRIO	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	7
1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1. <i>QUORUM SENSING</i>	8
1.2. DROGAS ANTIPATOGÊNICAS	14
1.3. CROMENONAS	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Revisão bibliográfica sistemática	20
4.2. Síntese, purificação e caracterização de cromenonas sintéticas-	20
4.3. Modelo experimental	21
4.4. Ensaio 1 – Luminescência em leitura de ponto final	21
4.5. Ensaio 2 – Correlação entre luminescência e densidade óptica -	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Atividades biológicas de cromenonas e cromanonas descritas na literatura revisada	24
5.2. Cromenonas sintéticas como inibidoras de <i>quorum sensing</i> em	

<i>Vibrio harveyi</i>	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AHL – Acil homoserina lactona

AI – Autoindutor

AI-1 – Autoindutor 1

AI-2 – Autoindutor 2

AIP – Peptídeo autoindutor

DPD – 4,5-diidroxi-2,3-pentanodiona

HAI-1 – 3-hidroxibutanoil-HSL

HSL – Homoserina lactona

L – litro

LUX – Luminescência

µL – microlitro

µM – micromolar

mL – mililitro

M – molar

nm – nanômetros

OD – Densidade óptica (*optical density*)

QS – *Quorum sensing*

QSI – Inibidor de *quorum sensing*

rpm – Rotações por minuto

R-THMF – [(2R, 4SL)-2-metil-2,3,3,4-tetraidroxitetraidrofuranona

SWC – *Sea Water Complex*

1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. QUORUM SENSING

Quorum sensing (QS) é um sistema de comunicação usado por microrganismos para monitorar a presença de outros e modular a expressão genética em resposta à densidade populacional, utilizando-se de sinais químicos genericamente denominados de autoindutores (AI). De forma sucinta, o acúmulo de um autoindutor no ambiente, que proporcionalmente reflete a densidade microbiana, é percebido por receptores específicos que atuam diretamente como ativadores transcricionais ou disparam cascatas de transdução de sinal alterando a expressão genética ¹. Assim, semelhante aos sistemas hormonais de organismos superiores, a informação transportada em forma de autoindutores é imprescindível para realizar ações sincronizadas de um grande número de células ². Entre os processos mediados por QS estão bioluminescência, formação de biofilme, expressão de fatores de virulência, transferência de DNA, dentre outros ³ (Figura 1). Embora inicialmente identificado em espécies bacterianas ambientais não patogênicas, atualmente sistemas de QS têm sido descritos em espécies bacterianas patogênicas de importância clínica, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e em fungos patogênicos, como *Candida albicans*.³



Figura 1. Quorum sensing: Um componente central de múltiplas funções.

Fonte: Adaptado de: BHARDAWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v.8, n.1, p. 68-83, 2013.

O primeiro sistema identificado de QS (LuxI/LuxR) foi descrito na espécie bioluminescente Gram-negativa *Vibrio fischeri*. O sistema, mediado pelo AI identificado como N-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL), é considerado um paradigma em relação à comunicação em bactérias Gram-negativas¹.

No sistema LuxI/LuxR, LuxI e seus homólogos são sintetases, proteínas responsáveis pela produção de N-acil-homoserina lactonas (AHL), denominadas de autoindutor 1 (AI-1). A proteína LuxR é o receptor citoplasmático desse sinal e que se comporta como ativador transcricional quando ligado ao AI-1. Após a síntese, o AI-1 se difunde através da membrana plasmática, sendo então liberado para o ambiente. Como cada bactéria está produzindo e excretando esse sinal, em condição de alta densidade populacional o AI-1 passa a se difundir de volta para a célula, onde se liga ao LuxR, que por sua vez ativa a transcrição genética⁴ (Figura 2A). Embora descoberto em *V. fischeri*, o sistema LuxI/R já foi identificado em outras

espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia carotovora* ³. Os sistemas LuxI/R geralmente prestam a comunicação intra-específica e vale destacar que a especificidade do sinal e a capacidade de cada espécie distinguir seus sinais daqueles produzidos por outros microrganismos dar-se-ão por pequenas alterações na molécula do autoindutor cognato ¹.

Na espécie *V. harveyi*, foi identificado o sistema de QS denominado AI-2/LuxS que é amplamente distribuído entre espécies bacterianas Gram positivas e negativas. Neste sistema, a enzima LuxS converte ribose homocisteína em homocisteína e 4,5-diidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), um composto que será convertido a furanonas, também conhecidas como AI-2. Um corresponde ao furanosil borato diéster, usado por *V. harveyi* para bioluminescência, e o outro foi identificado como [(2R, 4SL)-2-metil-2,3,3,4-tetraidroxitetraidrofuranona (R-THMF)]. Assim como o AI-1, os AI-2 são liberados pelo microrganismo, acumulam-se no ambiente e depois retornam à célula. Entretanto, há diferenças na detecção da molécula sinal. Existem dois mecanismos distintos para a detecção dos diferentes AI-2. O furanosil borato diéster liga-se à proteína específica LuxP no periplasma e em seguida o complexo AI-2/LuxP interage com um sensor quinase, LuxQ, iniciando uma cascata de fosforilação que, através da desativação da resposta negativa do regulador LuxO, resulta em produção de luciferase, enzima que oxida compostos orgânicos e libera energia e luz (Figura 2B). De forma simplificada, LuxO fosforilado inibe a expressão de luciferase, enquanto a forma desfosforilada libera a expressão de luciferase e permite, assim, o processo que culmina na emissão de bioluminescência. Ao contrário desse primeiro mecanismo, para o segundo AI-2, o sistema denominado LSR transporta o AI-2 para o citoplasma celular. A detecção começa com o reconhecimento do sinal pela proteína periplasmática LsrB. Uma vez ligado, o transportador LSR ABC, composto por LsrA e LsrC, importa o AI-2 para a célula, onde será fosforilado por LsrK. A forma fosforilada desse AI-2 então interage com o repressor transcricional, prosseguindo ao processo de transcrição gênica ⁴ (Figura 2).

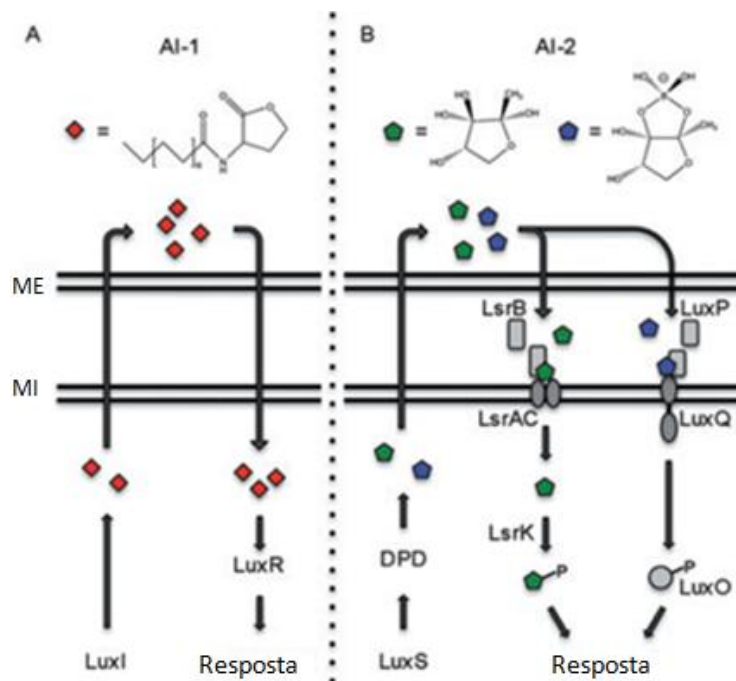


Figura 2. Duas estratégias de autoindução em bactérias Gram negativas. Legenda: A) Comunicação baseada no AI-1 usando acil homoserina lactonas (sinais vermelhos). AI-1 é sintetizado por LuxI e liberado no ambiente. Como AI-1 se difunde de volta para a célula, ele interage com LuxR e resulta em resposta celular. B) Comunicação baseada no AI-2 usando R-THMF (pentágonos verdes) ou furanosil borato diéster (sinais azuis), ambos criados a partir do derivado de LuxS, DPD. Em *Vibrio spp*, o furanosil borato diéster interage com LuxP no periplasma e inicia a cascata de fosforilação de LuxQ/LuxO, mas em outros organismos R-THMF é importado para a célula e fosforilado pelo sistema Lsr. ME = Membrana externa; MI = Membrana interna.

Fonte: Adaptado de: PARKER, C.T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell sinalling during pathogenesis. **Cellular Microbiology**, Dallas, v.11, n.3, p. 363-369, 2009.

Um sistema de comunicação exclusivo de bactérias Gram-positivas baseia-se em um modelo inicialmente identificado em *S. aureus*. Ao invés de uma molécula pequena, aqui o autoindutor é um polipeptídeo genericamente denominado (AIP), que desempenha dupla função: atua como autoindutor para o microrganismo que o produziu, mas como inibidor para os outros. O exemplo máximo de especificidade ocorre justamente em *S. aureus*, em que a sequência primária de seus AIP permitiu classificar as cepas em quatro subgrupos e, surpreendentemente, os AIP não só ativam exclusivamente seu receptor cognato como inibem por competição os receptores apresentados pelas outras variedades de *S. aureus*¹.

Os AIP são codificados pelo gene *AgrD*. Após a tradução, o propeptídeo *AgrD* volta-se para a membrana pela sequência de sinal N-terminal. Na membrana, *AgrB*, uma endopeptidase, cliva o C-terminal do propeptídeo. Após ser liberado e se acumular no ambiente, o AIP é reconhecido pelo receptor *AgrC*, que, na presença do AIP correto, fosforila o regulador de resposta *AgrA*. Fosforilada, *AgrA* ativa a transcrição gênica (Figura 3). O duplo papel de ativador ou inibidor está relacionado à interação AIP/*AgrC*. A estrutura cíclica de AIP é necessária para a ligação com *AgrC*, mas é a porção N-terminal que é responsável pela ativação de *AgrC* ⁴.

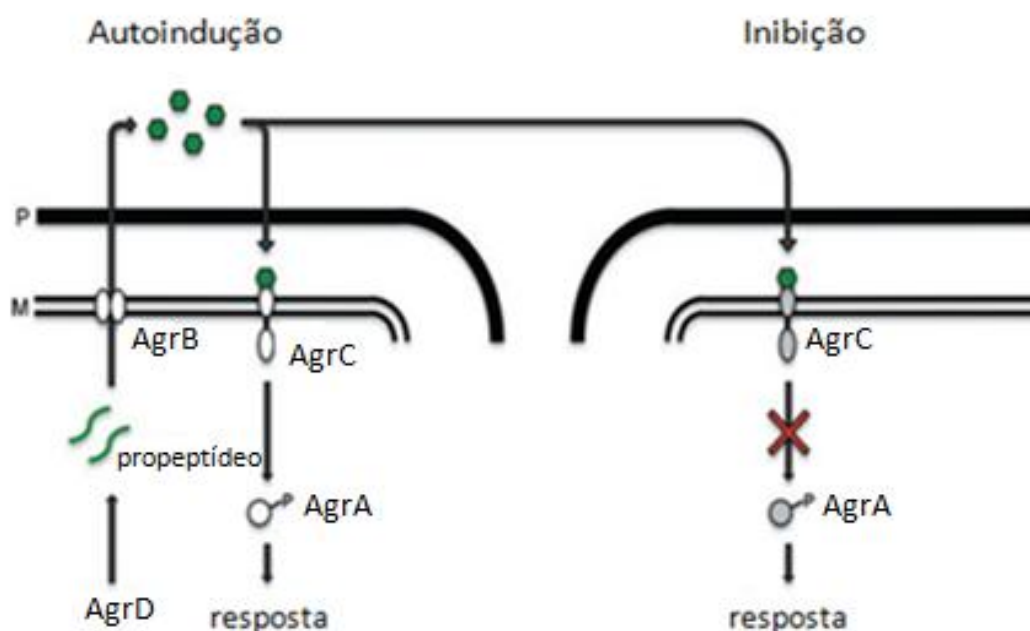


Figura 3. Autoindução baseada em AIP e inibição de células Gram-positivas usando polipeptídeos. Legenda: Propeptídeo, codificado por *AgrD*, é processado por *AgrB* e liberado no ambiente onde pode ativar a cascata *AgrC/AgrA* ou inibir a mesma cascata de diferentes espécies. M = membrana. P= peptídeoglicano.

Fonte: Adaptado de: PARKER, C.T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell sinalling during pathogenesis. **Cellular Microbiology**, Dallas, v.11, n.3, p. 363-369, 2009.

Além desses sistemas básicos de sinalização de QS, existem aqueles que são híbridos entre os sistemas para microrganismos Gram-negativo e Gram-positivo, como ocorre em *V. harveyi*. Esta espécie utiliza três vias de comunicação. Assim como nas bactérias Gram-negativas, *V. harveyi* produz uma acil-homoserina lactona (AHL) denominada HAI-1 (3-hidroxibutanoil-HSL); entretanto, esse autoindutor lactona é detectado por um sensor histidina quinase (*LuxN*) associado à membrana

citoplasmática que é semelhante aos sensores de AIP encontrados em espécies de Gram-positivos. A síntese de HAI-1 é realizada pela enzima LuxM, que catalisa a mesma relação de LuxI descrita anteriormente para o sistema LuxI/R^{1,5}. O segundo sinal é o furanosil borato diéster cujo mecanismo de ação já foi descrito no sistema AI-2/LuxS. Por fim, o terceiro sinal utilizado por *V. harveyi*, denominado CAI-1, é produzido pela enzima CqsA e detectado pelo sensor histidina quinase CqsS^{1,6}. No sistema híbrido de *V. harveyi*, as informações das três vias de sinalização são canalizadas para uma via em comum de controle de bioluminescência formada pelas proteínas LuxU e LuxO, respectivamente uma histidina fosfotransferase e o ativador transcricional¹. Na ausência dos AIs os três sensores atuam como quinases promovendo posteriormente a fosforilação de LuxO. LuxO fosforilado ativa a transcrição de cinco pequenos RNAs reguladores que atuam desestabilizando o RNA mensageiro de um segundo ativador transcricional, LuxR, que controla o operon *lux* e portanto a produção de luciferase, enzima responsável pela reação que gera luminescência. Dessa forma, em baixa densidade populacional essa via de fosforilação promove a degradação do RNAm *LuxR* e consequentemente inibe a produção de luciferase e bioluminescência¹ (Figura 4). De maneira simplificada, a figura abaixo demonstra a cascata de fosforilação em baixa densidade populacional e na ausência de AI, situação que leva à inibição de LuxR e consequente ausência de luminescência. Na presença de AI, os sensores quinases são convertidos a fosfatases, assim, LuxU não transfere fosfato a LuxO, que em sua forma desfosforilada não promove a expressão dos pequenos RNAs e portanto não promove a degradação de LuxR, o que permite a transcrição de *luxR*, produção de luciferase e a expressão de bioluminescência.

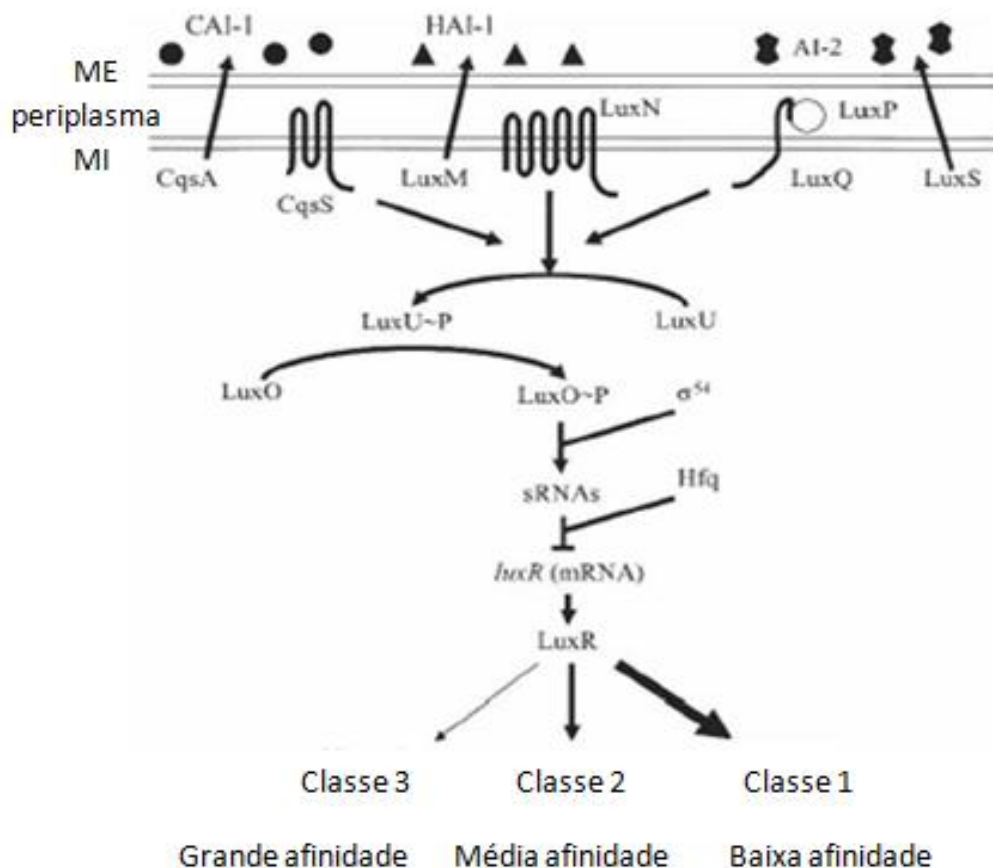


Figura 4. Modelo do sistema de *quorum sensing* de *V. harveyi*. Legenda: Três sistemas de sensores convergem para controlar os níveis do regulador mestre, LuxR. Círculos, triângulos e pentágonos duplos representam CAI-1, HAI-1 e AI-2 respectivamente. As setas indicam o sentido da cascata de fosforilação no estado de baixa densidade populacional. Nesse estado, os sensores quinases fosforilam LuxO que por sua vez ativa pequenos RNAs que inibem o regulador mestre LuxR, impedindo a emissão de luminescência. Em alta densidade populacional e na presença de AI, as quinases são convertidas a fosfatases, então LuxO não é fosforilado, não ativa os pequenos RNAs e então deixa o ativador transcricional LuxR livre, o que possibilita em última instância a expressão de luminescência. ME = membrana externa. MI = membrana interna.

Fonte: Adaptado de: WATERS CM, BASSLER BL. The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. **Genes & Development**, Princeton, v.20, p. 2754-2767, 2006.

1.2. DROGAS ANTIPATOGÊNICAS

Diversos patógenos clinicamente importantes regulam a expressão de fatores de virulência e estabelecem interações patogênicas através de QS, que passa a ser visto como um eficiente mecanismo utilizado para controlar a virulência bacteriana

em escala populacional ². Além da importância para esse processo, o QS está envolvido em diversos outros mecanismos de adaptação e resposta a estímulos ambientais que interferem na relação com o hospedeiro, possibilitando a sobrevivência do microrganismo e infecções crônicas subsequentes ³. Dentre esses mecanismos destaca-se a formação de biofilme, entendido como uma comunidade bacteriana ligada a uma superfície e abrigada em uma matriz extracelular, que geralmente é impermeável a antibióticos ⁷.

Com a emergência de cepas multirresistentes a antibióticos surge à necessidade de descobrir novas alternativas terapêuticas. No entanto, a rápida seleção de cepas resistentes não tem sido acompanhada pelo pronto desenvolvimento de novos antimicrobianos pela indústria farmacêutica. O tema exerce tamanha importância atualmente que o Brasil, por meio da resolução RDC nº 20, de 05 de maio de 2011, que substitui todas as normas anteriores sobre o tema, dispôs sobre o controle de antimicrobianos para reter uma das receitas e restringir o acesso a essa classe de medicamentos ⁸. O objetivo de tal legislação é reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos na tentativa de desacelerar o processo de resistência bacteriana no país. Além desse tipo de medida, o desenvolvimento de novos medicamentos que visam atuar sobre a virulência em vez do crescimento bacteriano mostra-se bastante promissor, assumindo uma posição de vanguarda no combate a infecções bacterianas. Essas drogas, denominadas antipatogênicas, baseiam-se em moléculas antagonistas de *quorum sensing* que visam atenuar a virulência ao invés do crescimento bacteriano. Assim, uma variedade de análogos a AI tem sido pesquisada para a descoberta de inibidores de *quorum sensing* (QSI) ⁹.

QSI não ameaçam a bactéria expondo-a a uma situação de vida ou morte, reduzindo, assim, a pressão seletiva por fenótipos resistentes. Além disso, sinais de QS são altamente específicos, o que minimizaria a ocorrência de efeitos diretos sobre o organismo hospedeiro ³.

A busca por QSI trouxe a discussão de algumas características desejadas visando um inibidor ideal. Entre elas destacam-se: ser um composto com baixa massa molecular; ser altamente específico para o sistema de QS alvo; não deve interferir em processos metabólicos basais da célula bacteriana como a síntese de proteínas, metabolismo de ácidos nucleicos, ou na formação da parede celular, pois

estes são processos vitais e fortes alvos para desenvolvimento de resistência à droga. Além disso, o inibidor ideal deve ser uma molécula quimicamente estável, resistente ao metabolismo do hospedeiro e não deve promover efeitos adversos ³.

Nesse contexto, inibidores de QS podem atuar sobre processos imprescindíveis ao sistema de comunicação, tais como a síntese e atividade do autoindutor; a detecção do sinal pelo receptor; ou a ativação dos reguladores transcricionais de QS ^{3,10}.

Cromenonas, assim como seus precursores sintéticos e derivados, são compostos que apresentam grande diversidade estrutural e destacam-se por serem biologicamente ativos ¹¹⁻⁴⁴. Com essa variedade estrutural e de efeitos biológicos, cromenonas surgem como potenciais agentes para atuarem sobre QS.

1.3. CROMENONAS

As cromenonas compreendem uma superclasse de compostos orgânicos heterocíclicos pertencentes ao grupo dos cromenos. Nesses compostos, o núcleo principal recebe o nome de cromano. Com a presença do grupo funcional carbonila (C=O) ligado a dois átomos de carbono, a substância torna-se uma cetona, devendo-se introduzir o sufixo “ona”, com o número indicando no núcleo cromano a posição da ligação C=O ⁴⁵ (Figura 5).

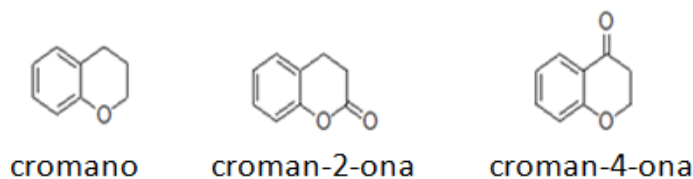


Figura 5. Estrutura molecular de cromanos, croman-2-ona e croman-4-ona.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao se acrescentar a ligação dupla C=C no cromano ele se torna cromeno. Como, ao colocar a dupla C=C, um carbono fica sem insaturação e com dois hidrogênios, deve-se informar na nomenclatura da cromenona qual carbono não possui a ligação dupla C=C. Daí o prefixo *4H* e *2H* ⁴⁵. (Figura 6)

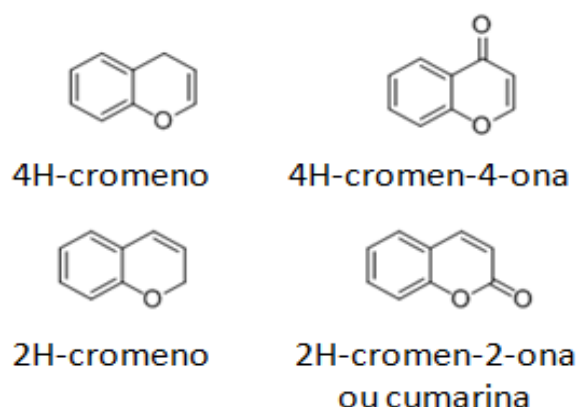


Figura 6. Estrutura molecular de cromenos, cromenonas e cumarina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As inúmeras estruturas e variações dessa classe de compostos têm sido pesquisadas ao longo dos anos no intuito de utilizar tais moléculas no campo da medicina. Entre os vários estudos conduzidos nesse sentido, está a busca por atividades antimicrobianas, principalmente efeitos antibacterianos e antifúngicos, atividade antineoplásica, antiinflamatória, hipoglicemiante, antiamnésica (inibidor da acetilcolinesterase), efeitos sobre o sistema imune, entre outros, além dos descritos para as cumarinas ^{11-44, 46}. Na Figura 6 acima, nota-se que a 2H-chromen-2-one trata-se de uma cumarina. A cumarina descrita acima, bem como outras cumarinas e alguns análogos, podem ser classificados quimicamente como pertencentes à classe das cromenonas e também exibem propriedades farmacológicas amplamente utilizadas na medicina. Entre as atividades biológicas descritas encontram-se os efeitos antiinflamatório, anticoagulante, antibacteriano, antifúngico, antiviral, anticancerígeno, anti-hipertensivo, antituberculose, anticonvulsivante, anti-hiperglicêmico, antioxidante e neuroprotetor ⁴⁶.

Visando explorar este potencial biológico, o Laboratório de Isolamento e Transformação de moléculas Orgânicas da Universidade de Brasília desenvolveu metodologias para a síntese de cromenonas a partir de reagentes disponíveis comercialmente ⁴⁷⁻⁵⁰. Nesse processo, duas cromenonas foram produzidas. Com o objetivo de avaliar o efeito dessas substâncias sobre sistemas de QS, a espécie *V. harveyi* foi utilizada neste trabalho para determinar a capacidade de inibição de QS de cromenonas sintéticas.

2. JUSTIFICATIVA

Desde a descoberta inicial de sinais de *quorum sensing* em *V. fischeri*, a estrutura química dos autoindutores (AI) tem sido objeto de muitos estudos. Os resultados demonstram que esses sinais podem pertencer a uma variedade muito grande de espécies químicas ¹⁻⁶.

Cromenonas apresentam grande diversidade estrutural e destacam-se por serem biologicamente ativas, havendo estudos que mostram efeitos antineoplásico e antimicrobiano, principalmente ¹¹⁻⁴⁴. Vislumbrando este potencial biológico e tendo à disposição uma coleção de cremenonas sintéticas produzidas a partir de reagentes disponíveis comercialmente, viabilizando sua produção, realizou-se um estudo de prospecção com estas substâncias sintéticas visando à identificação de inibidores de *quorum sensing*.

Em decorrência da crescente preocupação científica quanto à resistência bacteriana aos antibióticos, a descoberta de cremenonas como inibidores de QS agregará grande relevância científica aos estudos decorrentes deste projeto, podendo atribuir nova atividade biológica a essa classe de compostos, e incluirá os laboratórios envolvidos no inovador campo do desenvolvimento de drogas antipatogênicas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de cromenonas sintéticas sobre sistemas de *quorum sensing* em modelo experimental de *V.harveyi*, bem como realizar uma revisão bibliográfica acerca das atividades biológicas apresentadas por cromenonas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de duas cromenonas sintéticas sobre sistemas de QS de *V. harveyi*;
- Determinar diferenças na sensibilidade das vias de QS em *V. harveyi* diante das cromenonas testadas;
- Revisar a literatura sobre cromenonas, mas não a fim de esgotar todas as atividades biológicas descritas para esta classe, e sim para verificar a existência de atividade anti-*quorum sensing* já descrita;
- Confirmar uma nova atividade biológica para cromenonas por meio de revisão bibliográfica e de dados experimentais.

4. METODOLOGIA

4.1. Revisão bibliográfica sistemática

O levantamento de dados bibliográficos foi realizado no período de abril a outubro de 2013, na base de dados PubMed utilizando os descritores: *chromenone*; *chromanone*; e *coumarin*.

Para verificar a existência de registros relacionando cromenonas e QS, descritores combinados foram utilizados adicionando a palavra “and” ou o sinal de “+” com o intuito de delimitar a pesquisa bibliográfica. Utilizando essa estratégia os descritores explorados foram “*chromenone*” and “*quorum sensing*”; “*chromanone*” and “*quorum sensing*”; “*coumarin*” and “*quorum sensing*”; “*chromenone*” + “*quorum sensing*”; “*chromanone*” + “*quorum sensing*”; e “*coumarin*” + “*quorum sensing*”.

4.2. Síntese, purificação e caracterização de cromenonas sintéticas:

Cromenonas foram sintetizadas no Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas utilizando metodologias desenvolvidas nesta unidade e amplamente divulgadas ⁴⁷⁻⁵⁰. Em resumo os métodos de síntese utilizam reagentes disponíveis comercialmente como precursores e as reações envolvem a formação de ligações carbono – carbono entre duas substâncias químicas, a depender da cromenona sintetizada. O isolamento do produto sintético do meio reacional ocorre pela extração com solventes orgânicos adequados, e a purificação é realizada por meio de cromatografia, destilação e recristalização. Para a caracterização das substâncias sintetizadas foi utilizada análise espectrofotométrica de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (uni e bidimensionais), Infravermelho e Espectrometria de Massa. Duas cromenonas que denominamos de cromenona 6-oxo e 5-oxo foram testadas. Ambas apresentam estrutura molecular semelhante, sendo que a diferença entre elas reside unicamente na localização do grupo funcional carbonila. As cromenonas sintetizadas foram conservadas desidratadas a menos vinte graus Celsius (- 20 °C).

Para os ensaios, uma solução estoque foi produzida dissolvendo as cromoénonas em acetona 25%, atingindo uma concentração final de 5 mg/mL.

4.3. Modelo experimental.

A busca por inibidores de *quorum sensing* foi baseada no desenvolvimento de bioluminescência por cepas de *V. harveyi*; ensaio que é universalmente aceito como padrão ouro⁵¹. A escolha de *V. harveyi* como modelo experimental foi baseada na versatilidade e facilidade de sondar AIs, uma vez que essa bactéria apresenta sistema híbrido de QS e responde a várias vias de comunicação, além de expressar bioluminescência como resultado de QS, fenótipo bastante prático de se mensurar. A redução da luminescência, sem interferência no crescimento bacteriano, indica atividade inibidora de QS. Cepas mutantes em sensores específicos, e adquiridas da ATCC (*American Type Cell Culture*), foram usadas para sondar a atividade AI-1 (cepa de *V. harveyi* BB886 – sensor 1+, sensor 2-) e AI-2 (cepa de *V. harveyi* BB170 – sensor 1-, sensor 2+). Uma cepa selvagem de *V. harveyi* (BB120) também foi utilizada para definir quais tipos de cromoénonas geram interferência no sistema de *quorum sensing*. Foram desenhados dois tipos de ensaios com características diferentes para ler bioluminescência. O primeiro, de leitura de ponto final, permite visualizar quais cromoénonas interferem no QS e por qual via apresentam maior afinidade. O segundo ensaio, realizado em microplaca de 96 poços de fundo chato, permite analisar a cinética de crescimento e de inibição correlacionando luminescência (Lux) e densidade ótica (OD) a 650 nm. Todas as culturas de *V.harveyi* foram realizadas em meio SWC (*Sea Water Complex medium*) [750 mL de água marinha; 3 mL glicerol; 5 g de peptona; 0,5g de extrato de levedura; 50 mL de Tris base ([1 M], pH 7,5); água q.s.p. 1 L].

4.4. Ensaio 1 – Luminescência em leitura de ponto final.

Para a obtenção do pré-inóculo, 3 mL de meio SWC receberam inóculo de 40µL de suspensão bacteriana e foram incubados a 28 °C em condição estática por 24 h. Em seguida, as culturas foram diluídas 1:500 em meio SWC novo, em um tubo

cônico tipo Falcon com volume de meio ajustado para 40 mL e adicionado de solução aquosa de L-arginina (concentração final no meio de 1 mmol/L), um indutor de bioluminescência. Alíquotas de 4 mL da suspensão bacteriana foram transferidas para tubos Falcons (15 mL) para teste de inibição de QS com as cromenonas selecionadas em diferentes concentrações: 125 µg/mL (752 µmol/L) , 75 µg/mL (451 µmol/L) e 25 µg/mL (150 µmol/L). O sistema de ensaio foi incubado por 4 horas a 30 °C sob agitação constante (200 rpm). A bioluminescência resultante foi mensurada utilizando um luminômetro (Turner BioSystems TD-20/20 Luminometer). Ensaios controles foram realizados para estabelecer possíveis efeitos basais decorrentes dos solventes utilizados para solubilizar as cromenonas testadas. A densidade óptica (OD 650 nm) também foi mensurada para excluir a possibilidade de inibição do crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em duplicata. (Figura 7).

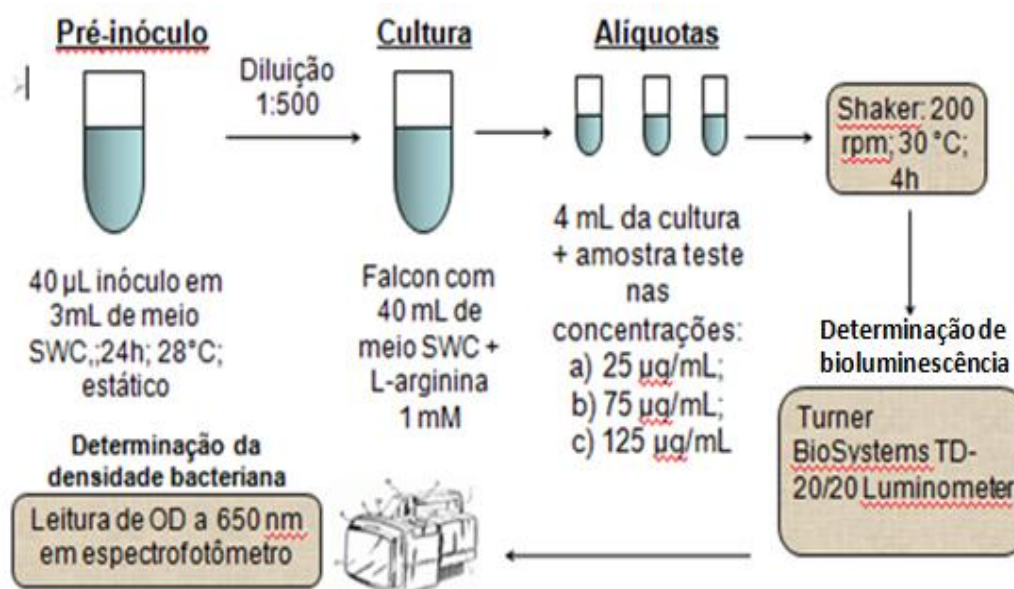


Figura 7. Ensaio 1: Luminescência em leitura de ponto final.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5. Ensaio 2 – Correlação entre luminescência e densidade óptica.

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços de fundo chato, sendo o volume final em cada poço de 150 µL. A placa, disposta horizontalmente, apresenta em suas três primeiras colunas o inóculo para controle de cultura, seguido de três colunas para controle do efeito do solvente das cromenonas (controle acetona), três

colunas com a cromenona 6-oxo na concentração constante de 125 µg/mL (752 µmol/L) e outras três colunas com a cromenona 5-oxo na mesma concentração. A L-arginina adicionada teve concentração final de 2 mmol/L. O inóculo inicial, uma cultura de 18 horas a 28 °C em meio SWC, foi diluído de forma seriada ao longo das linhas, sendo que na primeira fileira sua diluição estava 1:4, na segunda 1:8 e assim sucessivamente. Dessa forma, foi possível traçar uma curva de associação entre a densidade óptica (OD), atingida no final do experimento, e a luminescência (LUX) produzida pela cepa repórter. Após essa etapa, houve incubação de 6 horas a 28 °C em estufa bacteriológica e crescimento estático. A leitura de OD a 650 nm e luminescência foi realizada no aparelho SpectraMax M2^e (Molecular Devices). Para descartar a hipótese de atividade bactericida ou bacteriostática das cromenonas fez-se leitura de OD durante o ensaio e após 24 horas deste. O experimento foi realizado em duplicata. (Figura 8).

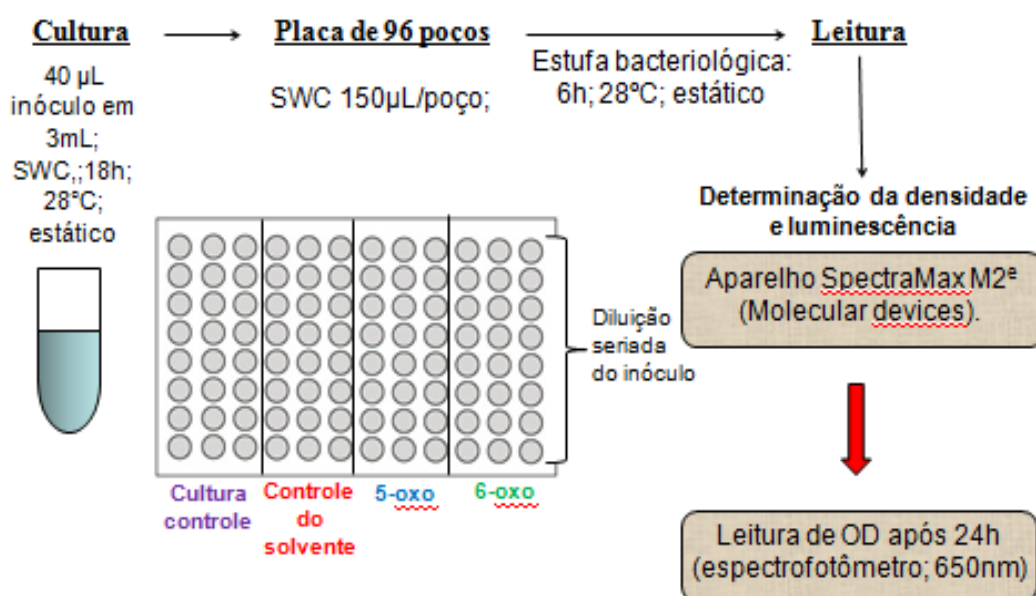


Figura 8. Ensaio 2 – Correlação entre luminescência e densidade óptica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividades biológicas de cromenonas e cromanonas descritas na literatura revisada.

As cromenonas e as cromanonas compreendem uma superclasse de compostos orgânicos heterocíclicos. Portanto, a diversidade estrutural inerente a essa classe possibilita a busca por diferentes efeitos farmacológicos.

O levantamento bibliográfico realizado no PubMed com o termo “*chromanone*” encontrou 100 artigos científicos, enquanto a pesquisa para “*chromenone*” retornou 50 resultados. Do total desses 150 estudos, 34 artigos (22,7% do total) relatavam atividades biológicas desses compostos. Entre os efeitos encontrados estão antimicrobianos, principalmente antibacteriano e antifúngico; atividades antineoplásica, antiinflamatória, hipoglicemiante e antiamnésica (inibidor da acetilcolinesterase); entre outras ações descritas na Tabela 1¹¹⁻⁴⁴. Notavelmente, os efeitos mais descritos são antimicrobiano e antitumoral, correspondendo a mais da metade dos artigos encontrados.

Tabela 1. Atividades biológicas descritas para cromenonas e alvos relacionados.

Atividade descrita	Alvos conhecidos	Referência
Antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária)	Transcriptase reversa de HIV-1	11,13, 24, 26, 27, 28, 29, 33, 39, 40, 42.
Antitumoral/ antineoplásica	Fosfatidilinositol (PI) 3- quinase B; Proteína quinase dependente de DNA (DNA- PK); Aurora quinase; Células cancerígenas MDA- MB-231 e MCF-7; Sulfatase esteroide (STS) Fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1)	12, 18, 19, 22, 30, 32, 34, 35, 36,44.

Inibidor da anidrase carbônica	Anidrase carbônica	17
Inibidor da interleucina 5 (IL-5)	IL-5	14
Antiamnésica/ tratamento de Alzheimer	Acetilcolinesterase	21, 37
Antagonista de bradicinina	Receptor B1 de bradicinina	15
Antipsicótica atípica		16
Antiinflamatória		43
Protetor gástrico, Antiúlcera	Malondialdeído (MDA) e Catalase (CAT)	41
Tratamento de glaucoma	Receptores de dopamina D1 e D2	31
Anti-hiperglicêmica (hipoglicemiante)	Alfa-glicosidase	23
Antidepressiva	Receptor 5-HT1A;	20
Tratamento de diabetes mellitus tipo II	Acetil-CoA carboxilase (ACC)	38
Efeito sobre o sistema imune inato – melhora da resposta imune		25

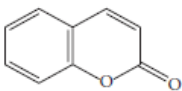
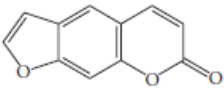
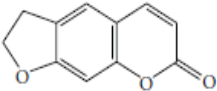
Fonte: Elaborado pelo autor.

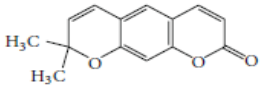
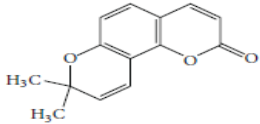
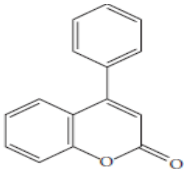
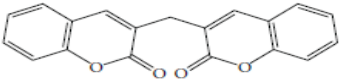
Nenhum resultado foi encontrado para a pesquisa utilizando os descritores combinados “*chromenone*” and “*quorum sensing*”; “*chromanone*” and “*quorum sensing*”; “*chromenone*” + “*quorum sensing*”; “*chromanone*” + “*quorum sensing*”; indicando a ausência de relatos científicos indexados na base de dados PubMed para este tema.

Um aspecto que pode ter levado a um baixo retorno referente aos termos utilizados na pesquisa bibliográfica é que os descritores utilizados, *chromanone* e *chromenone*, correspondem à nomenclatura química padronizada, enquanto muitos estudos utilizam os nomes comuns derivados de nomenclatura não oficial, como por exemplo, cumarina. Como já mostrado, a cumarina corresponde à substância denominada de 2H-cromen-2-ona, portanto esta assim como outras cumarinas derivadas são oficialmente classificadas como cromenonas. No entanto, devido a um

amplo histórico de atividades biológicas e farmacológicas associadas ao termo cumarina ⁴⁶ (Tabela 2), a maioria dos estudos opta por fazer referência ao termo classicamente conhecido (cumarina) ou derivações deste. Embora a levantamento bibliográfico explorando o termo “*cumarin*” tenha retornado um total de 8.154 artigos relacionados, a utilização dos descritores combinados “*coumarin*” + “*quorum sensing*” e “*coumarin*” and “*quorum sensing*” não retornou qualquer resultado.

Tabela 2. Diferentes tipos de cumarinas e suas propriedades farmacológicas.

Tipo de cumarina	Estrutura química geral	Atividade farmacológica
Cumarinas simples		Anti-inflamatória Anticâncer Antiadipogênica Antioxidante Antibacteriana Neuroprotetora Antifúngica Anticonvulsivante Antitumoral Antituberculósica (Anti-TB) Anti-hiperglicêmico
Furano cumarinas		Anti-inflamatória Antibacteriana Antifúngica Antiviral Anticâncer Anti-TB Anticonvulsivante Inibidor do citocromo p-450
Di-hidrofurano cumarinas		Antibacteriano Anti-TB

Pirano cumarinas são de dois tipos		
Tipo linear		Antibacteriana Anti-TB
Tipo angular		Antiviral
Fenil cumarinas		-
Bicumarinas		Anticoagulante

Fonte: Adaptado de: VENUGOPALA, K.N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, Kwazulu-Natal, v. 2013 (2013), ID do artigo 963248, 14 páginas, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/963248>. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/963248/>>. Acesso em outubro de 2013.

5.2. Cromenonas sintéticas como inibidoras de *quorum sensing* em *V. harveyi*.

5.2.1. Ensaio 1.

Os ensaios de luminescência de ponto final (ensaio 1) demonstraram a atividade inibidora de QS da cromenona 6-oxo numa relação dose dependente, onde a concentração máxima testada de 125 µg/mL reduziu em mais de 85% a bioluminescência da cepa selvagem de *V. harveyi* BB120 em relação ao controle de crescimento ($88,0\% \pm 10,9$) e quase 90% ($89,7\% \pm 6,6$) em relação ao controle acetona (Figura 9). Vale destacar que tamanha inibição foi conseguida com uma dose pequena da amostra teste, somente 125 µg/mL (752 µmol/L). Os ensaios com as cepas mutantes (cepa BB886 – sensor 1⁺, sensor 2⁻ e cepa BB170 – sensor 1⁻, sensor 2⁺) demonstraram uma ação antagonista mais eficiente da cromenona 6-oxo sobre o sistema responsivo ao AI-1. As inibições de QS evidenciadas com a cepa BB886 foram, em média, acima de 95%, tanto em relação ao controle de crescimento ($97,5\% \pm 2,7$) quanto em relação ao controle acetona ($97,0\% \pm 2,5$),

quando testados 125 µg/mL da cromenona. Entretanto, a cepa BB170, responsiva somente ao AI-2, apresentou inibições mais modestas com as mesmas concentrações testadas, chegando a pouco mais de 40% ($43,1\% \pm 27,8$) em relação ao controle de crescimento e 60% ($63,1\% \pm 5,6$) em relação ao controle acetona (Figura 9).

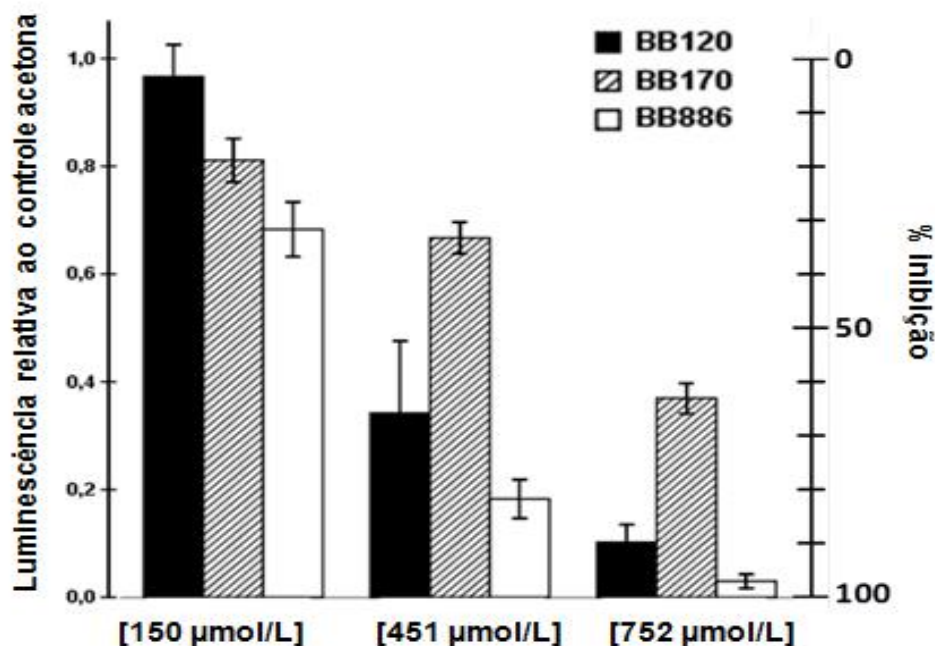


Figura 9. Efeito da cromenona 6-oxo sobre a luminescência de cepas repórteres de *V. harveyi*. Legenda: Gráfico com a inibição média de dois ensaios independentes da cromenona 6-oxo em relação ao controle acetona das três cepas testadas. As inibições máximas, atingidas com a maior concentração da 6-oxo (752 µmol/L), foram de $89,7\% \pm 6,6$ para a BB120; $63,1\% \pm 5,6$ para a BB170; e $97,0\% \pm 2,5$ para a BB886. Quando comparado aos respectivos controles essas reduções se mostraram estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

Nota-se também a influência do solvente (acetona 25%) sobre as cepas BB120 e BB170. Nestas cepas, a acetona produziu aumento na luminescência. Contudo, a acetona nas concentrações testadas não produziu efeito sobre a luminescência da cepa BB886 (Figura 10). A cepa BB170, não relatada na Figura 10, na presença de acetona 25% aumentou a luminescência em $33,9\% \pm 30$; $61,1\% \pm 52$; e $50,3\% \pm 47,5$ nos volumes de 20 µL, 60 µL e 100 µL, respectivamente.

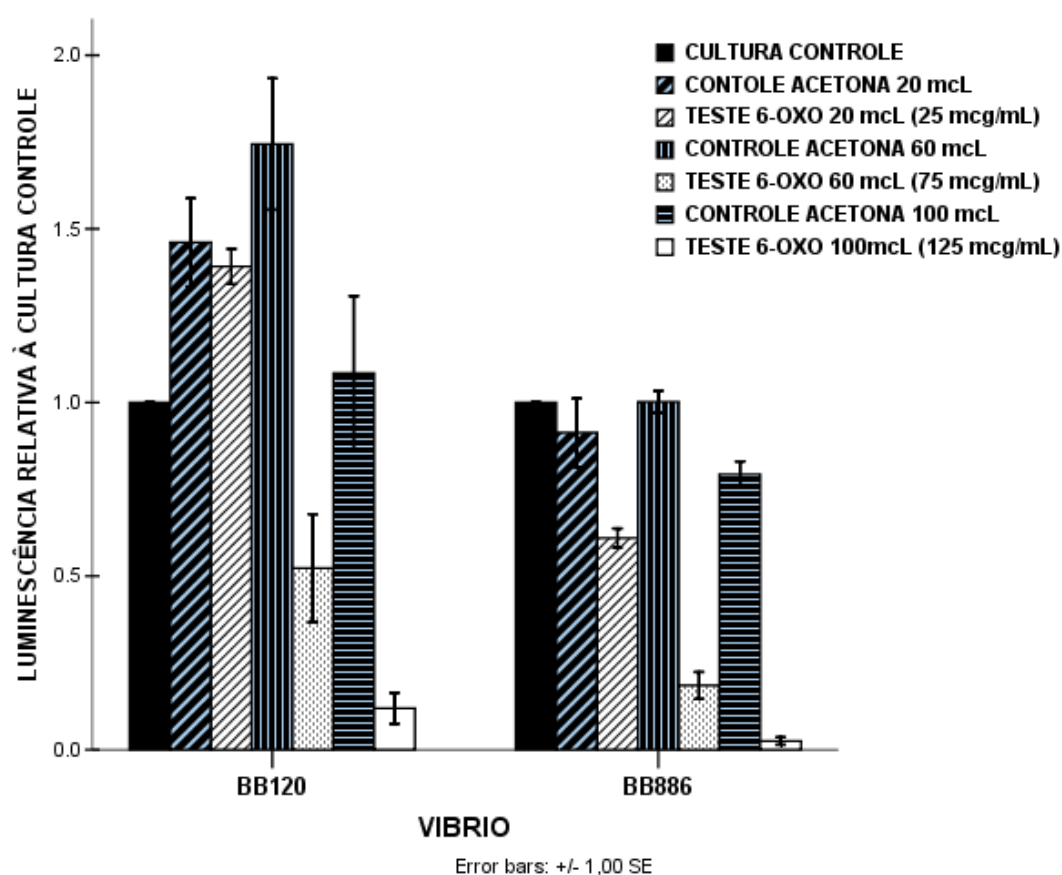


Figura 10. Efeito do solvente acetona e da cromenona 6-oxo sobre a luminescência das cepas BB120 e BB886 de *V. harveyi*. Legenda: O gráfico apresenta a média de dois ensaios independentes. O efeito do solvente acetona é visível na cepa BB120, na qual as quantidades de 20 μ L e 60 μ L estimularam o QS, induzindo aumento de 46,1% \pm 25,4 e 74,4% \pm 37,8 respectivamente ($P < 0.05$). Com 100 μ L de acetona o aumento foi somente de 8,41% \pm 44,5, não sendo estatisticamente significativa a diferença. Na cepa BB886 a luminescência se manteve próxima a valores normais na presença do solvente.

Todos os ensaios foram seguidos da leitura da densidade óptica (OD) para verificar qualquer efeito bactericida. Nos ensaios com a cromenona 6-oxo na máxima concentração testada (752 μ mol/L) houve uma redução média de OD de 14,7 % quando comparada à cultura controle (para a cepa BB120 quando comparado controle vs. teste: 0,216 \pm 0,083 vs. 0,201 \pm 0,047; para a cepa BB170: 0,383 \pm 0,009 vs. 0,324 \pm 0,0007; e para a cepa BB886: 0,425 \pm 0,033 vs. 0,319 \pm 0,023; respectivamente).

A segunda amostra testada, cromenona 5-oxo, em ensaio único levou a uma drástica redução na bioluminescência de todas as cepas testadas, atingindo valores

aproximados de 99% (dados não mostrados). Entretanto, a leitura de OD após o ensaio revelou grande redução da densidade bacteriana quando comparada aos controles de crescimento, levantando a possibilidade de ação bacteriostática, o que certamente influenciou os resultados (Tabela 3).

Tabela 3. Redução de OD provocada pela 5-oxo na cepa selvagem BB120.

Amostra	Densidade óptica	% em relação à cultura controle	Efeito sobre a OD
Controle BB120	0,147	100%	-
25 µg/mL de acetona 25%	0,212	144%	+ 44%
25 µg/mL (150 µmol/L) de 5-oxo	0,141	95,9%	- 4,1%
75 µg/mL de acetona 25%	0,186	127%	+ 27%
75 µg/mL (451 µmol/L) de 5-oxo	0,108	73,5%	- 26,5%
125 µg/mL de acetona 25%	0,210	143%	+ 43%
125 µg/mL (752 µmol/L) de 5-oxo	0,028	19,0%	- 81%

5.2.2. Ensaio 2.

Com o segundo tipo de ensaio realizado foi possível estabelecer uma curva relacionando crescimento bacteriano com luminescência em períodos de 5 a 7 horas de incubação, bem como a leitura da OD após 24 horas do ensaio. Este ensaio de cinética de bioluminescência comprovou que a inibição do QS não era um artefato gerado pela mera inibição do crescimento bacteriano. Como o primeiro ensaio determinou um maior antagonismo da cromenona 6-oxo sobre a cepa repórter BB886, somente esta cepa foi utilizada nesse ensaio.

Inicialmente, experimentos foram realizados para fixar uma curva de associação entre densidade óptica e luminescência, e estabelecer qual a melhor concentração de L-arginina a ser utilizada na indução da bioluminescência. A L-arginina foi adicionada numa concentração final máxima de 2 mmol/L e diluída seriadamente junto com o inóculo. Nota-se, na Figura 11, que o máximo de luminescência é alcançado entre a OD 0,3 e 0,4 na presença de 2 mmol/L de L-arginina.

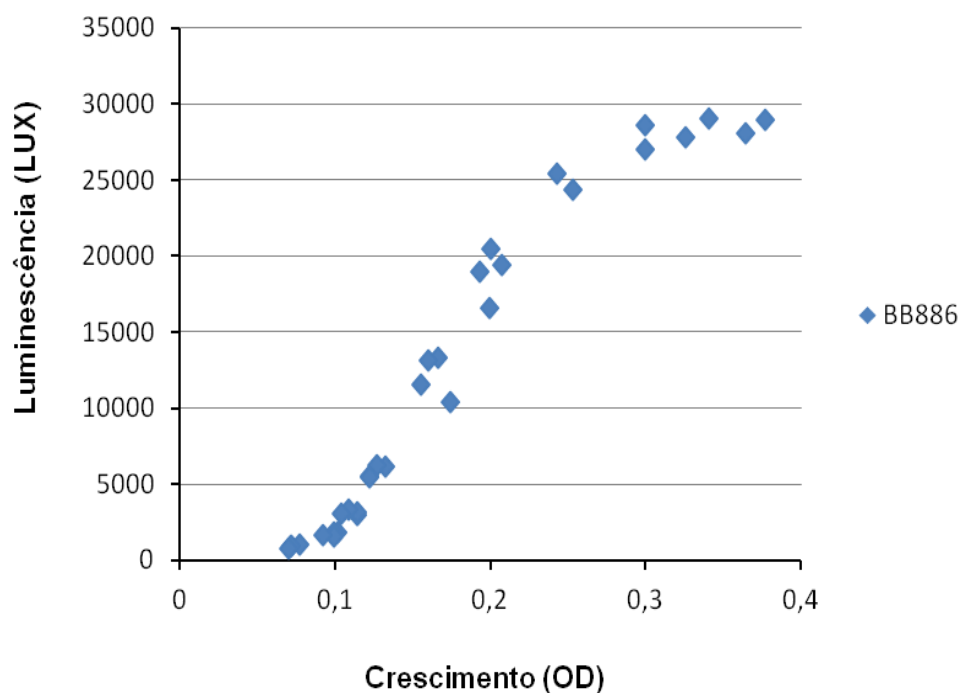


Figura 11. Curva de associação entre densidade óptica e luminescência da cepa de *V. harveyi* BB886. Legenda: O gráfico apresenta o resultado de um único experimento realizado em microplaca de 96 poços, 24 horas de incubação a 28 °C. Demonstra a correlação entre OD e LUX em condições normais de crescimento da cepa BB886 e reflete o início da curva de crescimento bacteriano. A L-arginina, um indutor de bioluminescência, foi adicionada e diluída seriadamente junto ao inóculo. A concentração máxima de L-arginina testada coincide com o máximo de LUX nas ODs de 0,3 a 0,4. A curva apresentou $R^2 = 0,98$.

A partir desse experimento piloto outros foram realizados para ratificar a atividade QSI da cromenona 6-oxo bem como verificar se a redução de OD vista no primeiro tipo de ensaio foi fator determinante para a redução da luminescência. Quanto a 5-oxo, esta também foi inserida nos ensaios para confirmar a hipótese de ação bacteriostática. O resultado dos experimentos é retratado no gráfico abaixo (Figura 12). A figura 12A ilustra qualitativamente a redução da luminescência decorrente do efeito da cromenona 6-oxo sobre a cepa repórter BB886.

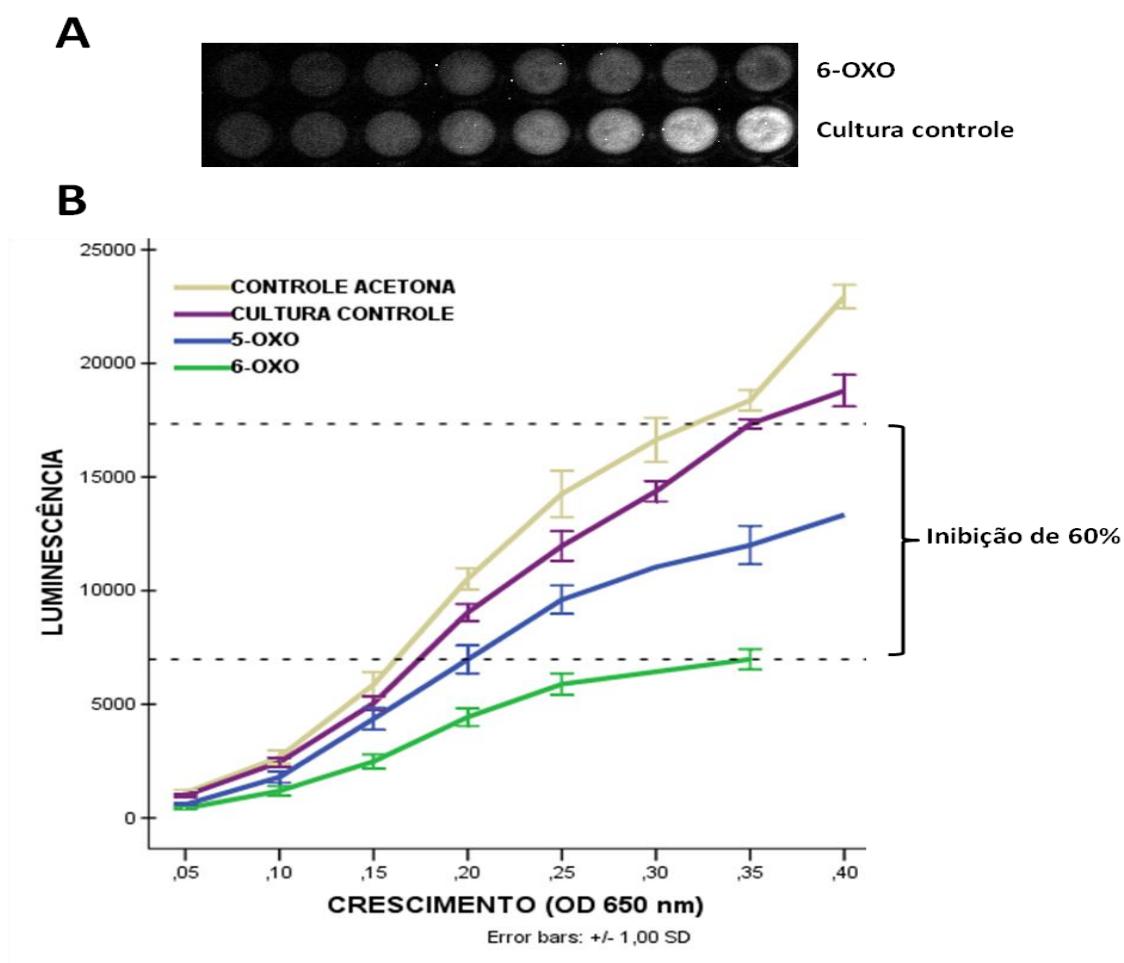


Figura 12. Ensaio de correlação entre OD e Luminescência (Ensaio 2). Legenda: **12A.** Visão qualitativa da inibição apresentado pela cromenona 6-oxo sobre a luminescência da cepa BB886. **12B.** Gráfico com a inibição comparativa de bioluminescência da cepa de *V. harveyi* BB886 com as cromenonas 5-oxo e 6-oxo.

Após 24 horas de incubação, a OD máxima alcançada pelos controles de crescimento e pelos testes com cromenonas se assemelham, indicando que as cromenonas 6-oxo e 5-oxo não apresentam atividade bactericida na concentração testada. No entanto, a relação OD x LUX foi reduzida significativamente na presença de 6-oxo e 5-oxo quando comparada aos controles. Dessa forma, uma das hipóteses para explicar a grande redução de OD vista no período de 4h após o primeiro tipo de ensaio com a 5-oxo é que este composto apresenta ação bacteriostática, o que prolongaria a fase *lag* de crescimento bacteriano nas primeiras horas de ensaio. Aliado a esse fato, notou-se que as reduções na bioluminescência com a segunda metodologia foram mais modestas para as duas cromenonas, sendo

que a 6-oxo inibiu aproximadamente 60% da luminescência da cepa de *V. harveyi* BB886, e a 5-oxo 30% quando testada a concentração de 125 µg/mL para ambas cromenonas neste mesmo ensaio. Enquanto pelo ensaio 1 não é possível separar o efeito da redução de OD na diminuição de bioluminescência, o que influencia diretamente os resultados, o segundo ensaio é muito mais controlado e permite calcular a relação OD x LUX, portanto seu valor é mais preciso e provavelmente reflete a real inibição de QS.

A elaboração do gráfico permitiu a confirmação do efeito inibidor de QS induzido pelas cromenonas e demonstra que a mudança na posição do grupo cetona exerce grande influência no efeito destas, quando comparadas 6-oxo e 5-oxo. Assim, pequenas mudanças na estrutura da molécula podem significar não só maior afinidade por um ou outro sistema de QS, como também maior inibição deste, possibilitando a descoberta de compostos altamente eficientes que podem servir de princípio ativo para novos medicamentos antipatogênicos.

No que tange à composição das substâncias utilizadas nos ensaios, as cromenonas testadas compõem uma mistura racêmica, ou seja, ambos isômeros ópticos estão presentes. Como já conhecido cientificamente, apenas um isômero exerce o efeito biológico desejado, o outro normalmente não exerce efeito algum, exerce atividade diferente ou então acaba atrapalhando a atividade do primeiro por competição ⁵². Dessa forma, a identificação e isolamento do isômero responsável pela atividade QSI reduzirá significativamente, podendo chegar a mais de 50%, a dose de cromenona necessária para obter a mesma inibição.

Por fim, sobre o possível mecanismo de ação das cromenonas, descarta-se a hipótese de atuarem sobre os reguladores transcricionais. No sistema híbrido de QS de *V. harveyi*, apesar de responder a várias vias, estas canalizam para uma via em comum dando início à regulação transcricional, ou seja, a inibição desta etapa exigiria o mesmo efeito QSI sobre as cepas mutantes, pois nesse caso inibe-se a via em comum. Entretanto, observou-se atividade inibidora preferencial sobre o sistema AI-1, representado pela cepa mutante BB886. Não há informações suficientes para embasar a afirmação que o mecanismo é por antagonismo de receptor, porque pode ser também por inativação do AI. Em qualquer das duas hipóteses, indica ser

específico para o sistema 1, com resposta inespecífica, talvez a altas doses, ao sistema 2.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de prospecção realizado com as cromenonas sintéticas 6-oxo e 5-oxo demonstrou atividade inibitória de ambas às substâncias sobre sistemas de *quorum sensing* da espécie bacteriana bioluminescente *V. harveyi*. Nos ensaios, foi possível estabelecer a maior afinidade das cromenonas pelo sistema responsivo ao autoindutor 1, representado pela cepa mutante BB886 (sensor 1+, sensor 2-).

No que tange à comparação entre as duas cromenonas testadas, a 6-oxo demonstrou-se um inibidor de QS mais potente, enquanto a 5-oxo, além do efeito QSI relativamente menor, também apresentou atividade bacteriostática temporária nas primeiras horas de crescimento bacteriano (fase *lag*). Dessa forma, como a única diferença entre as duas substâncias é a posição do grupo funcional carbonila (C=O), nota-se que a simples mudança no posicionamento deste grupo foi capaz de dobrar o efeito inibidor de *quorum sensing*, indicando que novas alterações possam produzir efeitos ainda maiores.

Também foi possível descartar a hipótese do mecanismo de ação estar relacionado à atuação sobre reguladores transcricionais, restando, entretanto, a elucidação se o mecanismo ocorre via inativação dos autoindutores ou por interferência nos receptores (antagonismo).

Quanto à revisão bibliográfica, nenhum resultado foi encontrado na base de dados PubMed relacionando cromenonas e *quorum sensing*, o que aponta o presente estudo como um dos pioneiros e indica nova função biológica para as cromenonas. A confirmação de que se trata realmente de nova atividade só pode ser dada com a revisão sistemática em todas as bases de dados e utilizando-se todos os descritores, tanto os de nomenclatura oficial (cromenona e cromanona) quanto não oficial (cumarina, entre outros), o que representa um trabalho muito grande e dispendioso de tempo, fugindo do alcance do presente estudo.

Portanto, de maneira geral, com este estudo foi possível determinar o potencial de cromenonas sintéticas como inibidoras de *quorum sensing*, constituindo

possíveis fármacos ou precursores de novas moléculas que podem servir, no futuro, como alternativas aos antibióticos no controle de infecções bacterianas. Neste contexto, pequenas alterações na posição de grupos funcionais ou a troca por outros grupos podem levar à descoberta e desenvolvimento de novas cromenonas ou análogos com elevada ação inibitória sobre sistemas de *quorum sensing*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WATERS C.M.; BASSLER B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2005, v.21, p. 319-346, 2005.
2. CAMILLI A.; BASSLER B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v.311, p. 1113-1116, 2006.
3. BHARDWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**. v.8, n.1, p. 68-83, 2013.
4. PARKER, C.T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cellular Microbiology**, Dallas, v.11, p. 363-369, 2009.
5. HENKE, L.M.; BASSLER, B.L. Bacterial social engagements. **Trends Cell Biol**, v. 14, p. 648-656, 2004.
6. JANG, L.H.; DONG, Y.H. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. **Mol. Microbiol.**, v. 53, p. 1563-1571, 2004.
7. BURMOLLE, M. *et al.* Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 59, p. 324-336, 2010.
8. BRASIL. Resolução RDC nº 20, de 05 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. **Diário**

Oficial [República Federativa do Brasil]. Brasília, DF, nº. 87, 09 mai. 2011. Seção 1, p. 39.

9. RASMUSSEN T.B.; GIVSKOV M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. **Int J Med Microbiol**, v.296, p. 149-161, 2006.
10. TAY, B.S. and YEOW, W.S. Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting gram-negative bacterial pathogens. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, p. 16570-16599, 2013.
11. GUPTA, S. *et al.* Ammonium derivatives of chromenones and quinolinones as lead antimicrobial agents. **Journal of Chemical Sciences**, v. 124, n. 2, p 437, 2012
12. BARLAAM, B.C. *et al.* Chromenone derivatives with anti-tumour activity. Patente no. publicação WO2011051704 A1, 2011.
13. PATIL, R.B. *et al.* Design, synthesis and pharmacological evaluation of chromenones and related analogues. **Int. J. of Pharm. Tech. Research**, v.4, n.1, p. 375, 2012.
14. VENKATESWARARAO, E. *et al.* Identification of novel chromenone derivatives as interleukin-5 inhibitors. **Euro. J. of Med. Chem.**, v.59, p.31 – 38, 2013.
15. BRYAN, M.C. *et al.* Chromenones as potent bradykinin B1 antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.22, p. 619-622, 2012.
16. BOLÓS, j. *et al.* 7-[3-(1-piperidiny)propoxy]chromenones as potential atypical antipsychotics. **J. Med. Chem.**, v.39, p. 2962-70, 1996.
17. BALBONI, G. *et al.* Flavones and structurally related 4-chromenones inhibit carbonic anhydrases by a different mechanism of action compared to coumarins. **Bioorg. Med. Chem.**, p. 3063-66, 2012.
18. HARDCASTLE, I.R. *et al.* Discovery of potent chromen-4-one inhibitors of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) using a small-molecule library approach. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 7829-46, 2005.

19. SHIN, S.Y. *et al.* Chromenylchalcones showing cytotoxicity on human colon cancer cell lines and in silico docking with aurora kinases. **Bioorg. Med. Chem.**, v.21, p. 4250-8, 2013.
20. HEINRICH, T. *et al.* Dual 5-HT_{1A} agonists and 5-HT re-uptake inhibitors by combination of indole-butyl-amine and chromenonyl-piperazine structural elements in a single molecular entity. **Bioorg. Med. Chem.**, v.12, p.4843-52, 2004.
21. ANAND, P. and SINGH, B. Synthesis and evaluation of substituted 4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl phenyl carbamates as potent acetylcholinesterase inhibitors and anti- amnesic agents. **Med chem.**, v. 9, p. 694-702, 2013.
22. NAGAIK, K. *et al.* Synthesis of new cis-fused tetrahydrochromeno[4,3-b]quinolines and their antiproliferative activity studies against MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.20, p. 3259-64, 2010.
23. RAJU, B.C. *et al.* alpha-Glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v.18, p. 358-65, 2010.
24. MA, Z.Y. *et al.* [Design, synthesis and in vitro antifungal activity of 3-substituted-methylenechroman-4-ones]. **Yau Xue Xue Bao**, v. 47, p. 614-8, 2012.
25. KIKUCHI, H. *et al.* Structures of the dimeric and monomeric chromanones, gonytolides A-C, isolated from the fungus *Gonytrichum* sp. and their promoting activities of innate immune responses. **Org. Lett.** V. 13, n. 17, p. 4624-7, set. 2011.
26. ARUMUGAN, N. *et al.* Synthesis of novel beta-lactam fused spiroisoxazolidine chromanones and tetralones as potent antimicrobial agent for human and plant pathogens. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.20, p. 3698-3702, 2010.

27. PAKASH, O.; KUMAR, R.; SEHRAWAT, R. Synthesis and antibacterial activity of some new 2,3-dimethoxy-3-hydroxy-2-(1-phenyl-3-aryl-4-pyrazolyl)chromanones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, 2009.
28. DO NASCIMENTO, A.M. et al. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Z. naturforsch.**, v.62, 2007.
29. EWI, D.G. et al. Binding model construction of antifungal 2-aryl-4-chromanones using CoMFA, CoMSIA, and QSAR analyses. **J. Agric. Food. Chem.**, v.53, p.1604-11, 2005.
30. VANANGAMUDI, A. et al. Cytotoxic effect of 2,3-disubstituted chromanones in human cancer cell lines. **Indian J. Exp. Bio.**, v. 37, p. 173-5, 1999.
31. BENOYT-GUYOD, M. et al. Syntheses and molecular structures of 3-N, N-di-n-propylamino-2-chromanones as new analogues of dopamine. **Bioogr. Med. Chem.**, v. 3, p. 1657-66, 1995.
32. CLAPHAM, K.M. et al. Potent enantioselective inhibition of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) by atropisomeric chromenone derivatives. **Org. Biomol. Chem.**, v. 10, 2012.
33. YEE, S.W. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of 7-O-substituted-4-methyl-2H-2-chromenone derivatives vs *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 20, 109-13, 2005.
34. LEAHY, J.J. et al. Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 6083 – 6087, 2004.
35. HORVATH, A. et al. 2-(1-adamantyl)-4-(thio)chromenone-6-carboxylic acids: potent reversible inhibitors of human steroid sulfatase. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 4268-4276, 2004.
36. NUSSBAUMER, P.; WINISKI, A.P.; BILICH, A. Estrogenic potential of 2-alkyl-4-(thio)chromenone 6-O-sulfamates: potent inhibitors of human steroid sulfatase. **J. Med. Chem.**, v. 46, n.23, p. 5091-5094, nov 2003.

37. PIAZZI, L. *et al.* 3-(4-[[Benzyl(methyl)amino]methyl]phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation: a dual function lead for Alzheimer's disease therapy. **J. Med. Chem.**, v. 46, p.2279 – 82, 2003.

38. GRIFFITH, D.A. *et al.* Spirolactam-based acetyl-CoA carboxylase inhibitors: toward improved metabolic stability of a chromanone lead structure. **J. Med. Chem.**, v. 56, p. 7110-9, 2013.

39. AYATI, A. *et al.* Synthesis, in vitro antifungal evaluation and in silico study of 3-azolyl-4-chromanone phenylhydrazones. **DARU J. of Pharm. Sci.**, v. 20, p. 46, 2012.

40. KANOKMEDHAKUL, S. *et al.* Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. **Planta Med.**, v. 68, n.9, p. 834-6, set. 2002.

41. LEMOS, L.M. *et al.* Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. **J. Ethnopharmacol.**, v. 141, n.1, 432-439, mai. 2012.

42. XU, Z.Q. *et al.* In vitro anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity of the chromanone derivative, 12-oxocalanolide A, a novel NNRTI. **Bioorg Med Chem Lett.**, v.8, p. 2179-84.

43. KINIECZNY, M. *et al.* New derivatives of 2-chromanone-4 as potential antiinflammatory drugs. II. 2-Carboxymethyl-3,6-diacetoxybenzo-(b)-furan and its amido derivatives. *Arch Immunol*, v. 24, p. 603-20, 1976.

44. DAY, J. *et al.* Benzochromenones from the marine crinoid *comantheria rotula* inhibit hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in cell-based reporter assays and differentially suppress the growth of certain tumor cell lines. **J. Nat. Prod.**, v.70, p. 1462-1466, 2007.

45. IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK (1997). (b) XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, and B. Kosata; updates compiled by A.D. Jenkins.

46. VENUGOPALA, K.N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, Kwazulu-Natal, v. 2013 (2013), ID do artigo 963248, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/963248>. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/963248/>>. Acesso em outubro de 2013.
47. MAHAJAN J.R.; RESCK I.S. Synthesis of acyclic insect pheromones from cycloalkanones via acetylenic lactones. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 383-390, 1997.
48. MAHAJAN J.R.; BOTELHO J.R.; RESECK I.S. Synthesis of 3,3-Dimethyl-5-oxo-6-alkyloctanolides by ring expansion of appropriately substituted cyclohexane-1-3-diones. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v.1, p. 13-16, 1990.
49. MAHAJAN J.R.; RESCK I.S. Synthesis of medium ring and macrocyclic acetylenic lactones by the ring expansion of oxabicycloalkenones. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v.8, p. 603-613, 1997.
50. RESCK I.S.; SANTOS M.L; New application of triphogene in a convenient synthesis of 3-aryl-1,3-benzoxazine-2,4-diones from Anacardic Acids. **Heterocycles**, v. 65, p. 311-318, 2005.
51. BASSLER B.L.; GREENBERG E.P.; STEVENS A.M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4043-4045, 1997.
52. COELHO, F. A. S. Fármacos e Quiralidade. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 3, mai. 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/quiral.pdf>>. Acesso em 10 de outubro de 2013.

